

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivona Spudić

UČINAK HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA RAZINU
OKSIDATIVNOG STRESA U
MONONUKLEARNIM STANICAMA
PERIFERNE KRVI I IZRAŽAJ GENA ZA
ANTIOKSIDATIVNE ENZIME U
KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Ivona Spudić

UČINAK HIPERBARIČNE
OKSIGENACIJE NA RAZINU
OKSIDATIVNOG STRESA U
MONONUKLEARNIM STANICAMA
PERIFERNE KRV I IZRAŽAJ GENA ZA
ANTIOKSIDATIVNE ENZIME U
KRVNIM ŽILAMA SPRAGUE-DAWLEY
ŠTAKORA

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren na Medicinskom fakultetu u Osijeku, na Katedri za fiziologiju i imunologiju, u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Martina Mihalj, dr. med.

Rad ima: 36 listova i 12 slika.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Martini Mihalj, dr. med., na velikoj pomoći, utrošenom vremenu i savjetima. Zahvaljujući njezinu strpljenju, razumijevanju i podršci, realiziran je moj diplomski rad.

Nadalje, zahvaljujem doc. dr. sc. Aniti Matić na dragocjenoj pomoći koja mi je uvelike uljepšala i olakšala rad u laboratoriju.

Pri nastanku ovog diplomskog rada na Katedri za molekularnu i kliničku imunologiju, ostvareno je moje stručno i znanstveno usavršavanje. U to ime, zahvaljujem svim svojim kolegama i prijateljima koji su bili uz mene ovih pet godina studija te učinili moje studiranje ljepšim. Osobito i od srca zahvaljujem svome kolegi i najboljem prijatelju, univ. bacc. med. lab. diagn. Petru Šušnjari, koji mi je bio velika podrška i potpora, kako tijekom ostvarivanja ovoga rada, tako i kroz cijelo studiranje.

I na kraju, posebno želim zahvaliti svojim roditeljima koji su mi omogućili školovanje te podržavali i poticali moju težnju prema sve višim ciljevima.

SADRŽAJ:

1.	UVOD.....	1
1.1.	Oksidativni stres	1
1.2.	Slobodni radikali.....	2
1.3.	Antioksidativni mehanizmi.....	4
1.3.1.	Antioksidativni enzimi	5
1.3.2.	Neenzimski antioksidansi.....	5
1.4.	Hiperbarična oksigenacija	6
1.4.1.	Primjena hiperbarične oksigenacije	6
1.5.	Mononuklearne stanice.....	8
2.	HIPOTEZA.....	11
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	12
4.	MATERIJALI I METODE.....	13
4.1.	USTROJ STUDIJE	13
4.2.	MATERIJALI (ISPITANICI).....	13
4.3.	METODE	14
4.3.2.	Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi Sprague-Dawley štakora.....	14
4.3.3.	Izolacija limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova	15
4.3.4.	Izolacija RNA.....	15
4.3.5.	Određivanje izražaja gena za antioksidativne enzime.....	16
4.3.6.	PCR u stvarnom vremenu	17
4.3.7.	Određivanje oksidativnog stresa u perifernim mononuklearnim stanicama	

	pomoću protočne citometrije	17
5.	REZULTATI	20
5.1.	Relativan izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga štakora	20
6.	RASPRAVA	25
7.	ZAKLJUČAK	29
8.	SAŽETAK	30
9.	SUMMARY	31
10.	LITERATURA	32
11.	ŽIVOTOPIS	36

POPIS KRATICA

ATP – adenzin trifosfat

ROS – reaktivni kisikovi spojevi

NOS/RNS – reaktivni dušikovi spojevi

O²⁻ – superoksid/superoksidni anion

OH[•] – hidroksilniradikal

RO²⁻ – peroksidni radikal

H₂O₂ – vodikov peroksid

HOCl – hipokloritna kiselina

O₃ – ozon

O₂ – molekula kisika

NO – dušikov monoksid

NO₂ – dušikov dioksid

ONOO[•] – peroksinitrit

SOD – superoksid dismutaza

GSPHx – glutation peroksidaza

AOx – alternativna oksidaza

GSTs – glutation transferaza

CAT – katalaza

GR – glutation reduktaza

NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid vodikov fosfat

HBO – hiperbarična oksigenacija

HBOT – terapija hiperbaričnom oksigenacijom

pO₂ – parcijalni tlak kisika

HbA1c – glikolizirani hemoglobin

BCR – B staničnireceptor

TCR – T staničnireceptor

Ig – imunoglobulin

MHC – glavni sustav tkivne podudarnosti

CD – klaster diferencijacije

Th – pomoćnički limfociti

IL – interleukin

IFN-γ – interferon gama

TNF- α – faktor nekroze tumora alfa
A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija
4D-HBO₂ – intermitentna HBO₂ tijekom 4 uzastopna dana
EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina
PBMC – mononuklearne stanice iz periferne krvi
FCS – fetalni goveđi serum
DMSO – dimetil-sulfoksid
DCF-DA – diklorofluorescein diacetat
PCR – lančana reakcija polimeraze
RT-PCR – lančana reakcija polimeraze u realnom vremenu
RNA – ribonukleinska kiselina
DNA – deoksiribonukleinska kiselina
cDNA – komplementarna DNA
dATP – deoksiadenozin trifosfat
dGTP – deoksigvanozin trifosfat
dCTP – deoksicitidin trifosfat
dTTP – tiamidin trifosfat
Taq polimeraza – termostabilna polimeraza
mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina
FGF – faktor rasta fibroblasta
HIF-1 α – inducibilni faktor hipoksije
FRAP – antioksidativni kapacitet plazme
PBS – fosfatni pufer

SLIKE

Slika 1: Normalna raspodjela elektrona u atomu

Slika 2: Normalna raspodjela elektrona u molekuli kisika

Slika 3: Hiperbarična komora

Slika 4: Shematski prikaz nastajanja limfocita

Slika 5: Slika prikazuje sloj odvojenih sastavnica krvi na gradijentu fikola

Slika 6: Izolirani mezenterični limfni čvorovi Sprague-Dawley štakora

Slika 7: Priprema suspenzije stanica mezenteričnih limfnih čvorova

Slika 8: Supernatant prikupljenih i pročišćenih PBMC-eva

Slika 9: Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na relativan izražaj izoformi superoksid dismutaze *Cu/Zn SOD* (A), *MnSOD* (B) i *EC-SOD* (C) antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga štakora

Slika 10: Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na relativan izražaj izoformi glutation peroksidaze *GPx1* (A) i *GPx4* (B) u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora

Slika 11: Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na relativan izražaj katalaze (*CAT*) u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora

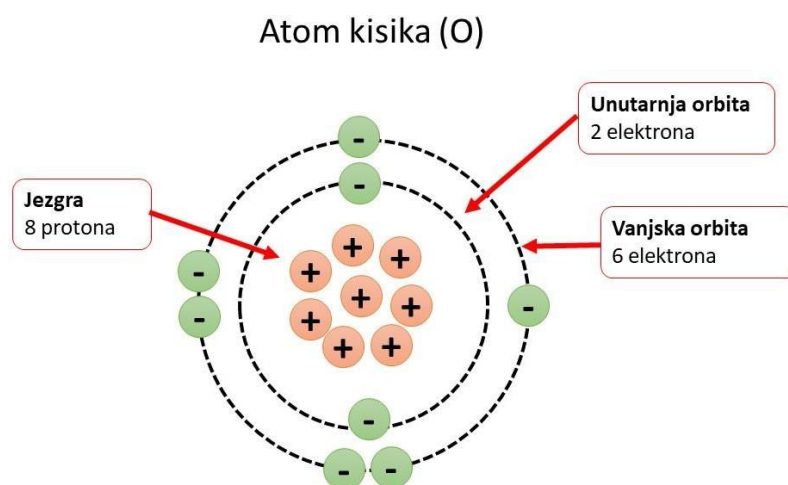
Slika 12: Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na razinu oksidativnog stresa u perifernim mononuklearnim stanicama Sprague-Dawley štakora

1. UVOD

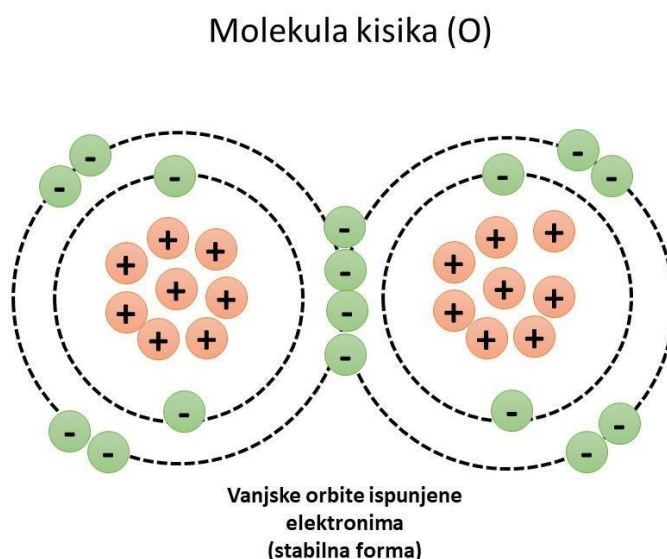
1.1. Oksidativni stres

Svim eukariotima kisik je potreban kako bi mogli stvarati ATP (engl. *adenosine triphosphate*), stoga stanični metabolizam pretežno ovisi o kisiku i njegovoj isporuci. Eukariotska stanica sposobna je efikasno prevoditi organske supstrate u kemijsku energiju, što istodobno zahtijeva i normalno funkcioniranje mehanizama koji će zaštititi stanicu od potencijalne reaktivnosti štetnih kisikovih vrsta (1). U svojoj kemijskoj strukturi kisik posjeduje dva vanjska, nesparena elektrona s kojima tvori dvostruku vezu između dva atoma, te ga takva veza čini kinetički stabilnim. U normalnim uvjetima kisik se prenosi vezan 97 % na hemoglobin, dok je ostatak otopljen u citoplazmi. Međutim, kao element neophodan za život, on je također i vrlo reaktivna molekula koja može postati i potencijalno štetna za organizam (1). Do njegove nestabilnosti i reaktivnosti dolazi kada se hemolitički cijepa kovalentna veza, pri čemu se formiraju slobodni radikali. Tada posjeduju nesparene elektrone u vanjskoj orbitali koji ih čine vrlo nestabilnima. Kako bi popunili slobodnu vanjsku orbitalu i postigli stabilnu elektronsku konfiguraciju, postaju agresivni prema okolnim molekulama te s njima stupaju u kemijske reakcije (2). Molekula s kojom reagiraju tako postaje novi slobodni radikal s potencijalom da sudjeluje u stvaranju sljedećeg slobodnog radikala, vodeći ka začaranom krugu reakcija (3).

Tijekom odvijanja različitih metaboličkih procesa, slobodni radikali normalna su pojava ukoliko je njihovo nastajanje i nestajanje u aerobnoj stanici uravnoteženo. Prema svemu navedenom, oksidativni stres predstavlja poremećenu homeostazu između stvaranja slobodnih radikala i njihovog eliminiranja iz organizma (4). Kakav će utjecaj oksidativni stres imati na organizam, ovisi o vrsti, sastavu i djelovanju oksidanasa te mjestu i intenzitetu njihova stvaranja (5). Čak i jako mali broj slobodnih radikala te njihovo nedovoljno i neučinkovito uklanjanje dovodi do oštećenja bioloških molekula. U tom slučaju, oksidativni stres može poremetiti normalne fiziološke funkcije i pospješiti razvoj brojnih bolesti (3).



Slika 1. Normalna raspodjela elektrona u atomu kisika (Izvor: original autorice rada)



Slika 2. Normalna raspodjela elektrona u molekuli kisika (Izvor: original autorice rada).

1.2. Slobodni radikali

Pod pojmom „slobodni radikal“ podrazumijevamo svaku molekulu koja sadrži jedan ili više nesparenih elektrona u svojoj vanjskoj elektronskoj ljusci. Osim u staničnim procesima, mogu nastati i od različitih egzogenih izvora. Od najvećeg su biološkog značaja slobodni kisikovi radikali, ROS (engl. *reactive oxygen species*) i dušikovi slobodni radikali, NOS (engl. *nitrogen oxide species*). Najvažnije vrste koje spadaju u ROS su: superoksid/superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), peroksidni radikal ($RO_2^{\cdot-}$) i alkoksilni radikal (RO^{\cdot}). U reaktivne kisikove vrste ubrajamo i spojeve koji se

lako mogu prevesti u slobodne radikale, kao npr. vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina (HClO), ozon (O_3) i samostalni kisik (O_2) (3).

ROS nastaju iz molekularnog kisika djelovanjem zračenja ili redukcijom oksidativnih enzima, inflamacijom, lijekovima, toksinima, faktorima rasta, lipidnom peroksidacijom, kao posljedica svakodnevnog načina života kao što je stres, pušenje, alkohol, zagađeni zrak, manjak sna, nezdrava prehrana i slično (5, 7, 8).

Glavno mjesto nastanka ROS-a u stanicama je respiratorni lanac koji u mitohondriju služi za prijenos elektrona i transport protona iz matriksa u međumembranski prostor. U ovom procesu molekularni kisik koristi se za dobivanje vode, a nastali gradijent protona služi za sintezu visokoenergetske molekule ATP-a i dobivanje elektrokemijskog potencijala. Preko 90% O_2 u organizmu sisavaca reducira se u H_2O primanjem 4 elektrona u respiratornom lancu mitohondrija (7, 8). Ostalih 1-2 % O_2 može se pretvoriti u H_2O_2 i visoko reaktivni OH^- i O_2^- koji se mogu proizvesti tijekom različitih reakcija u mitohondriju (9). Mitohondrijski respiracijski lanac jedan je od najvažnijih procesa u kojemu se stvara superoksidni slobodni radikal. Molekularni kisik difuzno je prisutan u stanicama i čvrsto vezan na kompleks citokrom c oksidaze. Njihova veza s prijenosnicima elektrona nije tako čvrsta, pa se neki od transportiranih elektrona mogu prenijeti na molekularni kisik stvarajući slobodne radikale (7, 8).

Osim sinteze ROS-a, mitohondrijski respiratorni lanac može sintetizirati i RNS. RNS su reaktivne vrste koje u svom sastavu, osim kisika, sadrže i dušik, kao npr. dušikov monoksid (NO), dušikov dioksid (NO_2) i peroksinitrit (ONOO^-). Oni mogu oksidirati proteine i nukleinske kiseline. Višak RNS-a vrši nitroziranje ili nitriranje staničnih molekula, uključujući proteine i glutation što se naziva stres reaktivnim radikalima dušika (10, 11, 12). U niskim koncentracijama NO je esencijalan neurotransmiter i vazodilatator.

Velik broj do sada provedenih istraživanja pokazao je kako neregulirana proizvodnja slobodnih radikala sudjeluje u patogenezi raznih upalnih stanja, kao što su alergije, upalne bolesti crijeva, reumatoidni artritis i tako dalje. Važno je spomenuti i lipidnu peroksidaciju kao posljedicu djelovanja slobodnih radikala na polinezasićene masne kiseline lipida. Osnovna sastavna jedinica svih staničnih membrana jesu lipidi, pa su tako sve organele sa staničnim membranama izložene direktnom oštećenju. Mijenja se fluidnost i propusnost membrane, smanjuje se njezin električni otpor, remeti se transport elektrolita kroz membranu i mobilnost membranskih proteina. Zbog svega navedenog, lipidna peroksidacija smatra se jednim od uzroka različitih kroničnih oboljenja kao što su:

ateroskleroza, dijabetes, Parkinsonova bolest, Alzheimerova bolest itd. (14). Osim toga, u posljednje vrijeme oštećenje proteina prepoznato je kao glavna meta djelovanja slobodnih radikala. Bočni lanci svih aminokiselinskih ostataka osjetljivi su na ROS, čije štetno djelovanje uzrokuje oksidaciju proteina. Time se mijenja proteinska struktura i funkcija, te se također narušava homeostaza proteina u plazmi, što se povezuje s nekim patofiziološkim stanjima i starenjem (15).

Međutim, ROS imaju važnu ulogu kao medijatori upale i signalne molekule, te u malim koncentracijama čine dio normalnih fizioloških procesa i korisno sudjeluju u obrani organizma. U slučajevima bilo kakve vrste ozljede tkiva, pa tako i upale, ključnu ulogu imaju fagociti, uključujući i neutrofile koji infiltriraju upaljeno tkivo. Tijekom takve vrste stimulacije, neutrofili otpuštaju velike količine toksičnih vrsta ROS-a (13).

1.3. Antioksidativni mehanizmi

Tvari koje inhibiraju stvaranje ROS-a ili RNS-a i njihovih prekursora nazivaju se antioksidansi. Oni neutraliziraju slobodne radikale prihvaćanjem ili doniranjem elektrona u bilo kojem trenutku. Neprestano se obnavljaju u tijelu, čime uspostavljaju ravnotežu između nastajanja i nestajanja slobodnih radikala. Ovakvim djelovanjem nastoje se oduprijeti stvaranju oksidacijskog stresa, sprječavaju daljnji nastanak lančanih reakcija slobodnih radikala, štite stanice od njihovih toksičnih učinaka i preveniraju nastanak bolesti (16). Uz pomoć vitamina i minerala, organizam je sposoban proizvesti antioksidanse, dok je njihov vanjski izvor hrana bogata antioksidansima (18). Dakle, kao odgovor na oksidativni stres, antioksidansi se generiraju *in situ* (stvaraju se u samom organizmu) – endogeni antioksidansi ili se unose u organizam – egzogeni antioksidansi. Prema mehanizmu djelovanja u ljudskom tijelu razlikujemo enzimске antioksidanse, neenzimske ili preventivne antioksidanse i „hvatače“ radikala. Enzimski antioksidansi katalizom slobodnih radikala izravno neutraliziraju ROS i RNS. S druge strane, neenzimski antioksidansi sprječavaju nastanak slobodnih radikala. Vežu ione metala, posebice željeza i bakra, te time sprječavaju nastajanje izrazito toksičnog hidroksilnog radikala iz superoksida i vodikovog peroksida. Hvatači slobodnih radikala najbrojnija su skupina antioksidanasa, i s obzirom na različite strukture i afinitete ostvaruju različite mehanizme antioksidativne zaštite. Ova skupina nema enzimsko djelovanje pa ih također možemo svrstati u neenzimske antioksidanse.

1.3.1. Antioksidativni enzimi

U antioksidativne enzime ubrajamo: superoksid dismutazu (engl. *superoxide dismutase*, SOD), glutation peroksidazu (engl. *glutathione peroxidase*, GSPHx), alternativnu oksidazu (eng. *alternative oxidase*, AOx), glutation S transferazu (engl. *glutathione S-transferase*, GSTs), katalazu (engl. *catalase*, CAT) i glutation reduktazu (eng. *glutathione reductase*, GR).

SOD katalizira superoksid u kisik i vodikov peroksid. Sudjeluje u obrani gotovo svih stanica izloženih aerobnom metabolizmu, pa je jedan od primarnih antioksidativnih čimbenika. CAT se smatra glavnim regulatorom metabolizma vodikovog peroksida zato što ga razlaže na manje reaktivne molekule kisika i vode. AOx je enzim koji regulira koncentraciju oksidiranog i reduciranog glutationa i NADPH (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Katalizira oksidaciju askorbinske kiseline u dehidrogen askorbinsku kiselinu. GSTs je multifunkcionalni, citosolni enzim koji katalizira konjugaciju glutationa s raznim elektrofilnim spojevima, gdje neutralizira sva elektrofilna aktivna mjesta i time stvara spoj topljiv u vodi. GPRx je membranski stabilizator, a nalazi se u svakoj stanici ljudskog organizma. Katalizira redukciju vodikovog peroksida i lipidnog hidroperoksida tijekom lipidne peroksidacije. GR je dimer koji katalizira regeneraciju reduciranog oblika glutationa uz NADPH kao donor elektrona (17).

1.3.2. Neenzimski antioksidansi

Neenzimskim antioksidansima pripadaju: glutation, flavonoidi, karotenoidi, vitamini C i E i koenzim Q10.

Glutation je najvažniji antioksidans u organizmu. Ima ulogu u detoksifikaciji donirajući nezasićenim spojevima svoj atom vodika. Sudjeluje u reakcijama s vodikovim peroksidom i s organskim peroksidima. Flavonoidi su biljni pigmenti koji uključuju flavone, izoflavone i flavanone. Djeluju kao antioksidansi peroksilnih i hidroksilnih radikala. Nakon apsorpcije u tijelu brzo se izlučuju i time detoksificiraju enzime u jetri. Karotenoidi su crveni, narančasti i žuti pigmenti koji se nalaze u listovima, cvjetovima i plodovima voća i povrća, a proizvode ih svi fotosintetski organizmi. Antioksidativno djelovanje im se pojačava u kombinaciji s vitaminom E. Vitamin C ili askorbinsku kiselinu najviše pronalazimo u voću i povrću, a kao antioksidans uključena je u mnoge biokemijske procese. Osim što sprječava oksidaciju drugih spojeva, ima sposobnost obnoviti vitamin E. Donor je elektrona za enzime uključene u sintezu kolagena, karnitina,

noradrenalina te metabolizam tirozina. Vitamin E nalazi se u staničnim membranama gdje učinkovito inhibira peroksidaciju lipida. U prirodi se nalazi u obliku tokoferola i tokotrienola, a dokazano je veća učinkovitost tokotrienola (17). Koenzim Q10 derivat je kinona i nalazi se posvuda u biološkim sustavima. Njegov smanjeni oblik je ubikvinol koji kao endogeni antioksidans povećava koncentraciju koenzima Q10.

1.4. Hiperbarična oksigenacija

Terapija hiperbaričnom oksigenacijom ili HBOT (engl. *hyperbaric oxygen therapy*) jest korištenje 100 % O₂ preko maske ili iz hiperbaričnog zraka, pri tlaku koji je iznad razine atmosferskog tlaka. Osim u terapijske svrhe, koristi se i u svrhe znanstvenih istraživanja s eksperimentalnim životinjama. Izlaganja najčešće traju 90 – 120 minuta pod tlakom od 2,0-2,5 bara uz različit broj ponavljanja. Udisanjem atmosferskog zraka, pri normalnom tlaku, zasićenost hemoglobina kisikom iznosi 97 %. U 100 mL krvi ima 19,5 % kemijski vezanog i 0,32 % nevezanog kisika koji u tijelo dopijeva udisanjem kisika iz zraka. Kada se udiše kisik pod hiperbaričnim uvjetima, nevezani kisik u plazmi raste do 6 %, dok hemoglobin veže do 21 % kisika. Odnosno, kada se tlak udahnutog kisika poveća za 100 kPa u 100 mL krvi, organizmu se dopremi oko 2,4 mL kisika. Pod ovakvim visokim tlakom povećava se arterijski i tkivni parcijalni tlak (pO₂), te se, neovisno o hemoglobinu, povećava koncentracija otopljenog kisika u plazmi. Kisik tako zaobilazi eritrocitnu membranu i brže dopijeva do tkiva, pa se njegovi nedostaci u ishemičnim tkivima na ovaj način mogu nadomjestiti (19 – 21). Povećavanjem parcijalnih tlakova plina smanjuje se njegov volumen, time se istiskuju mjehurići plina iz plazme, odnosno iz tijela, pa se ova metoda na početku koristila samo za dekompresijsku bolest ronilaca.

1.4.1. Primjena hiperbarične oksigenacije

Danas se HBOT uspješno primjenjuje kod insuficijencije disanja, plućnih i kardioloških bolesnika. S vremenom je dokazan njezin povoljan učinak i na mikrocirkulaciju, angiogenezu, proliferaciju stanica i sintezu kolagena. Fiziološke promjene prilikom djelovanja hiperbarične oksigenacije odnose se i na supresiju alfa-toksina kod kasne gangrene, što se iskorištava kod liječenja kroničnih rana poput dijabetičkih. Kod inzulin-ovisnih dijabetičara, oksigenacijom se, osim angiopatije i neuropatije, kontrolira i opći metabolički status ugljikohidrata. Uspješno smanjuje glukozu u krvi u prosjeku za 7,24 mm/L i vrijednosti glikoliziranog hemoglobina (HbA1c) za 31 %. Na vaskularnu strukturu i

funkciju utječe vazodilatacijski, povećavajući vaskularni odgovor na angiotenzin koji oslobađa NO iz endotela glatkih mišića. S pacijentima koji imaju hipertenziju izuzetno je važno dobro poznavanje utjecaja HBO na arterijski krvni tlak. Iako je oksigenacija pod visokim tlakom klinički korisna kod vaskularnih poremećaja, potpuni uvid njezinog utjecaja na krvožilni sustav nije razjašnjen. Objavljeni podatci su raznoliki, ponekad i kontradiktorni zbog uporabe različitih protokola istraživanja, vrsta ispitanika (ljudi, životinje), raznolikosti patologije ispitanika (zdravi, bolesni) i sl. Tako je objavljeno kako HBO dovodi do povišenja arterijskog tlaka, sniženja arterijskog tlaka ili da ne mijenja značajno arterijski tlak (24, 25). Njegova djelovanja su kompleksna u zamršenom sustavu signalnih putova. Na primjer, izlaganjem životinja hiperbaričnoj oksigenaciji povećava se hematokrit te dolazi do acidoze i pojačane metaboličke aktivnosti. Akutnim izlaganjem hiperbaričnoj oksigenaciji podiže se razina oksidativnog stresa, dok kronično izlaganje ne izaziva njegovo povećanje, što je dokazano u istraživanjima na zdravim štakorima (26). Kao što je ranije opisano, kisik može biti vrlo reaktivna molekula koja je u mogućnosti promijeniti ekspresiju proteina. Činjenica je kako njegovo udisanje pri tlaku iznad jednog bara neizbježno povećava proizvodnju ROS-a. Iako su dosadašnja saznanja o vaskularnim mehanizmima učinka HBO ograničena, poznato je kako oksidativni stres može izravno utjecati na vaskularnu reaktivnost. Stoga će se i u ovom radu obratiti pozornost na ulogu oksidativnog stresa u analizi učinaka HBO.

Klasične indikacije za kliničku upotrebu HBOT su: dekompresijska bolest, zračna embolija, trovanje cijanidom i ugljičnim monoksidom, nekrotizirajuće infekcije tkiva, kronične rane poput dijabetičkih rana ili dekubitalnih ulkusa, poteškoće s cijeljenjem kožnih presađaka, anemija zbog gubitka krvi itd. (21). U posljednjih nekoliko godina dominira u vaskularnoj patologiji povezanoj sa smanjenom ili nedovoljnom tkivnom oksigenacijom i perfuzijom (stanja hipoksije i ishemije). HBOT pozitivno utječe i u oporavku od infarkta miokarda i akutne periferne ishemije ekstremiteta, a također može smanjiti moždano oštećenje nakon cerebrovaskularnih incidenata (19). Prema smjernicama za HBO terapiju, preporučuje se primjena tlaka do 3,0 bara, pri kojemu su nuspojave rijetke, a sigurnost za pacijenta je veća. Ekstremno izlaganje tretmanu može dovesti do intoksikacije kisikom (iznad 4 bara), dok izlaganje tretmanu od 5 bara može dovesti do epilepsije te moždanih i srčanih udara (27).



Slika 3. Hiperbarična komora (Izvor: original autorice rada).

1.5. Mononuklearne stanice

Krvne stanice koje su odgovorne za imunost nazivaju se leukocitima, a agranulociti ili mononuklearni leukociti su vrsta leukocita koji sadrže jednu jezgru i pod optičkim mikroskopom ne sadrže obojena zrnca u citoplazmi. U ovu skupinu pripadaju limfociti, monociti i makrofazi. Svi leukociti nastaju u koštanoj srži. Dio njih, uključujući B limfocite, u koštanoj srži i sazrijeva, dok prekursori T limfocita migrijaju u timus gdje se odvija njihova daljnja diferencijacija u zrele T limfocite. Nadalje, T i B limfociti specifične su stanice u našem organizmu po tome što tijekom sazrijevanja preslagivanjem gena za T, odnosno B stanični receptor na staničnoj površini dobivaju jedinstveni receptor koji omogućuje prepoznavanje velikog broja stranih antigena, što nazivamo T i B staničnim repertoarom. Time se osigurava velika specifičnost stečenog imunološkog odgovora. Novonastali limfociti nazivaju se naivnim limfocitima jer se nikada nisu susreli s antigenom za koji su specifični. Nakon što se aktiviraju, u sekundarnim limfnim organima slijedi njihova proliferacija u pomoćničke i citotoksične T stanične linije, odnosno, u slučaju B limfocita, u plazma stanice (40).

Limfociti B posrednici su humoralne imunosti. Oni na svojoj membrani eksprimiraju imunoglobuline kao antigenske receptore (engl. *B-cell receptors*, BCR). Za

potpunu aktivaciju zahtijevaju pomoć pomoćničkih limfocita T, nakon čega se dijele i stvaraju klonove te diferenciraju u plazma stanice. Plazma stanice stvaraju protutijela kao primarni obrambeni odgovor organizma na antigen. Ovisno o vrsti imunosne reakcije, one luče imunoglobuline IgG, IgA, IgE i IgM, koji reagiraju sa polisaharidima i lipidima mikroorganizama. Kada u tijelo uđe antigen s kojim se organizam ranije suočio, već su prisutni brojni memorijski limfociti. Oni će prepoznati antigen i bit će u stanju proizvesti veliku količinu protutijela u kratkom vremenu. Ovaj odgovor naziva se sekundarnom reakcijom, koja je brža i snažnija (41).

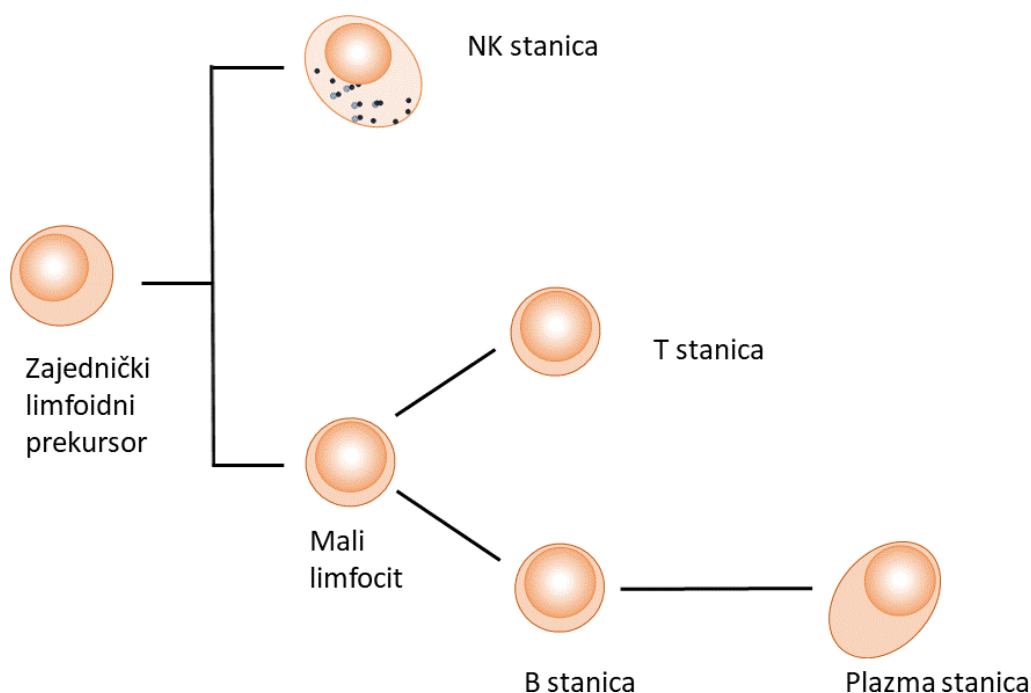
Limfociti T posrednici su stanične imunosti, a na svojoj površini imaju karakteristične biljege (engl. *T-cell receptors*, TCR). U završnom procesu sazrijevanja prolaze kroz pozitivnu i negativnu selekciju. Pozitivnom selekcijom uklanjaju se one stanice koje ne prepoznaju molekule glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC). Negativnom selekcijom uklanjaju se oni limfociti koji se vežu snažnim afinitetom za vlastite MHC molekule. Nakon ove selekcije, u timusu preostaju CD4⁺ CD8⁻ i CD4⁻ CD8⁺ (engl. *cluster of differentiation*, CD), koji odgovaraju pomoćničkim i citotoksičnim limfocitima T. Ovisno o vrsti podražaja, pomoćnički T limfociti imaju sposobnost diferencijacije u različite vrste Th stanica (eng. *T-helper*, Th), uključujući Th-1, Th-2, Th-17 i regulatorne T limfocite. Druga vrsta T limfocita su citotoksični limfociti T koji ekspimiraju molekulu CD8. Oni mogu lučiti IFN- γ i faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- α), koji se vežu na citokinske receptore ciljne stanice i uzrokuju njezinu apoptozu (42).

Monociti su mononuklearne fagocitne stanice koje nastaju u koštanoj srži, ulaze u krvožilni sustav gdje cirkuliraju 8-10 sati, a nakon toga migriraju u tkiva. U tkivima se pretvaraju u zrele makrofage, koji imaju sposobnost prepoznavanja i proždiranja/fagocitoze mikroorganizama, oštećenog vlastitog tkiva i ostalih stranih antigena. Makrofagi na svojoj površini imaju receptore za antitijela i molekularne obrasce.

Bez obzira na njihovu različitost nakon diferencijacije, svi leukociti u organizmu surađuju jedni s drugima u cilju obrane organizma. Osnovna uloga im je zaštita organizma od virusa, bakterija, gljivica i parazita.

Povećanje razine oksidativnog stresa dovodi do izražaja proupalnih citokina, TNF- α , IL-6, IL-8 te staničnih adhezivnih molekula, što uzrokuje pobuđivanje imunosnog sustava (46). Time se aktivira endotel, pokreće infiltracija leukocita u krvne žile i tkiva te može doći do upale koja vodi k razvoju ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti.

Međutim, u imunosnom sustavu ROS ima i fiziološku funkciju u signalizaciji, no taj signal može postati prejak ako traje predugo ili ukoliko se pojavi u pogrešno vrijeme i na pogrešnom mjestu. Unatoč ovakvim promjenama, stanice nastoje održavati ravnotežu i popravljaju oksidativnu promjenu katabolizirajući ROS antioksidativnim enzimima. Stvaranje ROS-a važan je mehanizam kojim stanice imunosnog sustava, u prvom redu makrofazi (monociti i neutrofili), uništavaju štetne organizme, što dovodi i do oštećenja normalnog tkiva domaćina. Učinci ROS-a na stanicu ovise o njezinoj izloženosti, što za posljedicu ima pojačanu zaštitnu funkciju antioksidativnih mehanizama.



Slika 4. Shematski prikaz razvoja limfocita (Izvor: original autorice rada)

2. HIPOTEZA

Polazna hipoteza ovoga rada bila je kako akutna hiperbarična oksigenacija uzrokuje prolazni porast oksidativnog stresa u mononuklearnim stanicama periferne krvi, koji tijekom intermitentnog izlaganja dovodi do kompenzatornih promjena u ekspresiji antioksidativnih enzima i posljedično normalizacije razine oksidativnog stresa u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi razinu oksidativnog stresa u mononuklearnim stanicama periferne krvi zdravih muških Sprague-Dawley štakora izloženih akutnoj i intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji te izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga istih životinja.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Studija je bila ustrojena kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje. Eksperimentalni postupci bili su u skladu s Europskim smjernicama za dobrobit laboratorijskih životinja koje se koriste u istraživanjima (Direktiva 210/63/EU) te ju je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/14-08/06, Ur.br. 2158-61-07-14-04) i Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (HR-POK-005).

Praktični dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za molekularnu i kliničku imunologiju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

4.2. MATERIJALI (ISPITANICI)

U istraživanju su korišteni zdravi Sprague-Dawley štakori muškog spola u starosti od 9 do 11 tjedana. Životinje su bile podijeljene u 3 skupine ($n = 6-8$ štakora u skupini).

- 1) Životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO_2) – A- HBO_2
- 2) Životinje podvrgnute intermitentnoj HBO_2 tijekom 4 uzastopna dana – 4D- HBO_2
- 3) Skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO_2

Svi štakori bili su uzgojeni u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku (MEFOS). Kako bi se smanjio stres, u dobi od 8-9 tjedana prebačeni su iz uzgojnog u eksperimentalni dio nastambe u svrhu adaptacije na novi prostor. Štakori iz grupe A- HBO_2 i 4D- HBO_2 bili su izlagani hiperbaričnom kisiku (100 % O_2) u rekompresijskoj komori za eksperimente na malim životinjama (110 L, Đuro Đaković, Aparati d.d.) pri tlaku od 2,0 bara tijekom 60 minuta, uz 15 minuta postepene kompresije i dekompresije.

Životinje su imale pristup hrani i vodi *ad libidum* te su bile izložene 12-satnom ciklusu svjetla i tame u eksperimentalnoj nastambi MEFOS vivarija. Posljednjeg dana pokusa životinje su bile žrtvovane dekapitacijom. Prije usmrćivanja bile su anestetizirane ketaminom (75 mg/kg, 25 mg/ml *Ketanest S, Pfizer*) i midazolamom (2.5 mg/kg, 5 mg/ml *Midazolam Torrex, Torrex Chiesi Pharma*). Pri tome je sakupljena puna krv u tubice koje su sadržavale 2 mM EDTA (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*) te izolirane moždane žile koje su bile adekvatno pohranjene do analize. Uzorci izoliranih moždanih žila te periferne krvi bili su prikupljeni i skladišteni (na -80°C) do provođenja pokusa, u Vivariju Medicinskog fakulteta u Osijeku i Laboratoriju za mikrocirkulaciju.

4.3. METODE

4.3.1. Protokoli za izlaganje hiperbaričnom kisiku

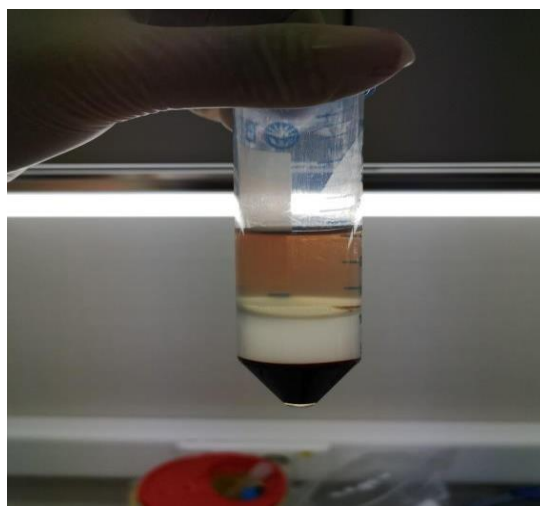
Štakori iz grupe A-HBO₂ i 4D-HBO₂ bili su izlagani hiperbaričnom kisiku (100 % O₂) u rekompresijskoj komori za eksperimente na malim životinjama (110 L, Đuro Đaković, Aparati d.d.) pri tlaku od 2,0 bara tijekom 60 minuta, uz 15 minuta postupene kompresije i dekompresije. Postupak se sastojao od smještanja kaveza s 3 eksperimentalne životinje u komoru, potom otvaranja kompresijskog ventila, pri čemu se komora punila stopostotnim kisikom. Tlak u komori tijekom sljedećih 15 minuta postupno se podizao, te je, nakon što je postignut tlak od 2 atmosfere, kompresijski ventil zatvoren. Nakon dva sata, slijedilo je 15 minuta dekompresije otpuštanjem dekompresijskog ventila.

4.3.2. Izolacija mononuklearnih stanica iz periferne krvi Sprague-Dawley štakora

Periferna krv sakupljena je u tubice koje su sadržavale 2 mM EDTA. Mononuklearne stanice iz periferne krvi, PBMC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) izolirane su na gradijentu fikola (*Ficoll-Paque PREMIUM 1,084*, GE Healthcare, Švedska). Potom je određena koncentracija stanica pomoću *Burker-Turk* komorice gdje smo koristili 50 µl suspenzije stanica i 100 µl otopine tripanskog plavila. Koncentracija je određena prema sljedećoj formuli:

$$\text{Koncentracija stanica} = (\text{BROJ STANICA}/4) \times 3 \times 10^4 / \text{ml}$$

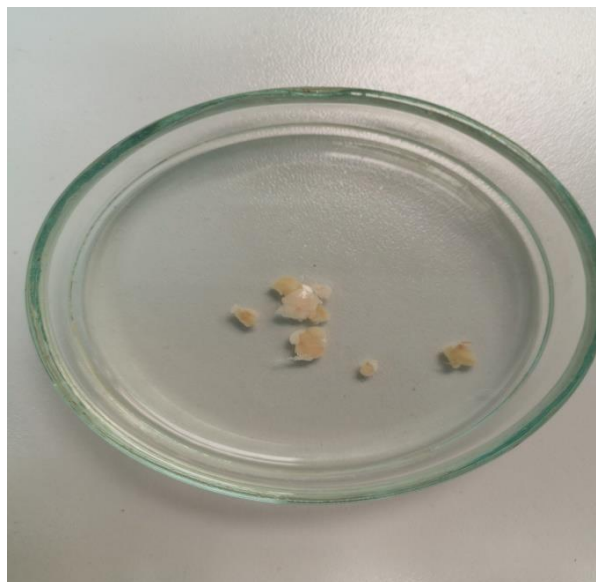
**dilucijski faktor je 3 (50 u 100 µl)*



Slika 5. Slika prikazuje sloj odvojenih sastavnica krvi na gradijentu fikola (Izvor: original autorice rada)

4.3.3. Izolacija limfocita iz mezenteričnih limfnih čvorova

Nakon žrtvovanja, štakorima je otvoren abdomen te su izolirani mezenterični limfni čvorovi preparacijom mezenterija. Suspenzija stanica mezenteričnih limfnih čvorova pripremljena je disocijacijom tkiva pritiskanjem limfnih čvorova između dva predmetna stakalaca te propuštanjem dobivene suspenzije kroz pamučnu vatu.



Slika 6. Izolirani mezenterični limfni čvorovi Sprague-Dawley štakora
(Izvor: original autorice rada)



Slika 7. Priprema suspenzije stanica mezenteričnih limfnih čvorova
(Izvor: original autorice rada)

4.3.4. Izolacija RNA

Kako bismo upješno analizirali ekspresiju gena od interesa, potrebno je izolirati RNA visoke čistoće i integriteta. Homogenizacija uzoraka provedena je prema protokolu koji je preuzet iz znanstvenog rada *Chomczynski P i sur. (28)*. Uzorak smo izolirali iz

moždane krvne žile, usitnili smo ga pomoću tekućeg dušika, tučkom tarionika. Kako bismo dobili supernatant RNA, ovoj smjesi bilo je potrebno dodati 1 mL trizola (monofazna otopina gvanidinijska izotiocijanata, *Life Technologies*, SAD). Za odvajanje svih slojeva, dodajemo 100 µL 1-brom-3-klorpropana (*Merck Schuchardt, OHG*, Njemačka). Uzorke smo potom promućkali s nekoliko naglih pokreta i ostavili smo ih 8 minuta kako bi se mogli inkubirati na sobnoj temperaturi. Nakon prve inkubacije, slijedilo je centrifugiranje uzoraka 15 minuta na 12000 okretaja. Dobiveni supernatant odvojili smo u sterilne *Eppendorf* tubice. RNA smo odvojili od preostalog staničnog sadržaja dodavanjem 500 µL izopropanola u svaku tubicu. Uzorke smo potom promućkali s nekoliko naglih pokreta i ostavili smo ih 8 minuta kako bi se mogli inkubirati na sobnoj temperaturi. Nakon toga, slijedilo je centrifugiranje uzoraka 15 minuta na 12000 okretaja. Dobiveni supernatant odvojili smo u sterilne *Eppendorf* tubice. RNA smo odvojili od preostalog staničnog sadržaja dodavanjem 500 µL izopropanola (GRAM-MOL d.o.o., Republika Hrvatska) u svaku tubicu. Uzorke smo zatim lagano promućkali 20 sekundi i ostavili na sljedeću inkubaciju od 8 minuta, nakon čega su se ponovno centrifugirali 15 minuta na 12000 okretaja. Sve smo isprali s 1 mL 75 %-tnog etanola, a postupak se ponavljao dva puta, bez mućkanja uzoraka. Slijedilo je posljednje centrifugiranje na 7500 okretaja 5 minuta, čišćenje etanolom i sušenja uzoraka. Nakon dodavanja 30 µL vode pročišćene od nukleaze (eng. *nuclease-free water*, *NFW*, *Lonza*, Belgija), mjerili smo koncentraciju RNA i njezinu čistoću.

4.3.5. Određivanje izražaja gena za antioksidativne enzime

Izražaj gena za antioksidativne enzime u izoliranim moždanim žilama određen je pomoću PCR-a u stvarnom vremenu (od engl. *real time polymerase chain reaction*, RT-qPCR). Nakon izolacije, žile mozga smrznute su u tekućem dušiku te pohranjene na -80 °C do izvođenja pokusa. Analizirana je ekspresija gena izoforme superoksid dismutaze (*Cu/Zn SOD*, *MnSOD*, *EC-SOD*, *CAT*, *GPx1* i *GPx4*). U tu svrhu korišten je uređaj *Bio Rad CFX96*. Izolacija ukupne ribonukleinske kiseline (engl. *ribonucleic acid*, RNA) iz homogeniziranih uzoraka provedena je prema protokolu od *Chomczynski P* i sur. (28), a pročišćavanje uzoraka od deoksiribonukleinske kiseline (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) te sinteza komplementarne DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) prema uputama proizvođača komercijalnih setova za iste (*Sigma-Aldrich* i *Applied Biosystems*).

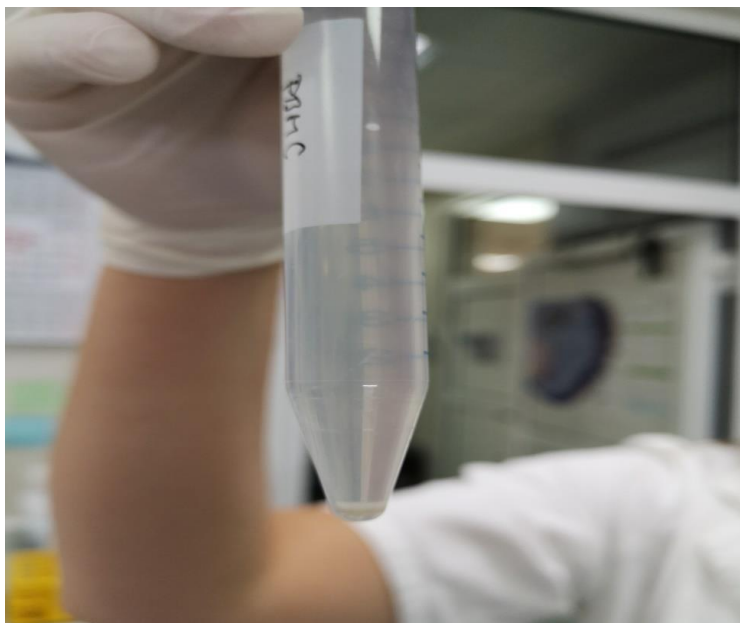
4.3.6. PCR u stvarnom vremenu

U ovom radu istražena je ekspresija gena iz uzoraka štakorskih moždanih žila, odnosno aorti. Geni, čiji je izražaj mjeren, bili su: izoforme superoksid dismutaze (*Cu/Zn SOD*, *MnSOD*, *EC-SOD*), katalaza (*CAT*) te glutation peroksidaze 1 i 4 (*GPx1* i *GPx4*). Metoda koju smo koristili u ovu svrhu bila je RT-qPCR, na uređaju *Bio Rad CFX 96*. U osnovi je vrlo jednostavna, kvantitativna metoda koja se koristi još od sredine 1990-ih godina, kada ju je otkrio znanstvenik *Kary Mullis*. Ima mogućnost brze amplifikacije DNA te uspješno analizira rezultat u 30 minuta. Ovakvim umnažanjem dobiva se dovoljna količina željenog produkta koji zatim možemo koristiti u svrhu daljnjih istraživanja. RT-PCR kombinacija je standardnog PCR-a i mjerenja fluorescencije, a umnaža relativno kratke odsječke DNA (100-500 parova baza) u velikom broju kopija. U usporedbi sa standardnim PCR-om, preciznija je, dok su nedostaci skupoća opreme i reagensa. Reakcijska PCR smjesa je kalup u kojem se nalaze: cDNA, četiri deoksiribonukleotida (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), oligonukleotidne početnice, enzim Taq DNA polimeraza, ioni magnezija (Mg^{2+}), PCR pufer i fluorescentna boja (*SYBR Green I*, *Sigma-Aldrich*, *SAD*) ili fluorescentno obilježene oligonukleotidne probe. *SYBR Green I* boja je koja, neovisno o slijedu DNA baza, veže nespecifično u utore dvolančane DNA. Nakon vezanja DNA jako fluorescira, dok se na jednolančanu DNA ne veže. Nukleinske se kiseline eksponencijalno umnažaju ciklusima koji se ponavljaju. U svakom se ciklusu denaturira, odnosno razdvaja roditeljska DNA (pri 95 °C, 15 s). Potom slijedi hlađenje (na 55 do 60 °C), što omogućuje hibridizaciju tj. sljepljivanje početnica sa komplementarnim sljedovima. Posljednji korak je elongacija pri 72 °C gdje ključnu ulogu ima Taq DNA polimeraza. U svakom ciklusu kraj DNA se skraćuje, a novi DNA lanac je kalup za vezanje početnica i sintezu nove DNA u svakom ciklusu koji slijedi. Ova metoda je svoju primjenu uspješno pronasla u različitim znanstvenim područjima, a najviše u genetičkim istraživanjima. Koristi se za kvantifikaciju ekspresije gena, genotipizaciju, detekciju patogena i sl. U kliničkoj praksi služi za dijagnostiku nekih nasljednih i neoplastičnih, malignih bolesti. Također je vrlo korisna u forenzičnim i identifikacijskim dokazivanjima.

4.3.7. Određivanje oksidativnog stresa u perifernim mononuklearnim stanicama pomoću protočne citometrije

Tehnike protočne citometrije sve su važnije u suvremenoj kliničkoj medicini, ponajviše zahvaljujući mogućnosti objektivne, osjetljive, brze i točne analize relativno velikog broja staničnih svojstava. Istodobno je kvalitativna i kvantitativna metoda koja

analizira različite pojedinosti u svakoj stanici. Tako prepoznaje fizičke razlike stanica (veličina i zrnatost) i imunološke parametre (biljezi). Tehnike protočne citometrije postaju sve važnije u suvremenoj kliničkoj medicini, a najviše u imunologiji i hematologiji. Protočni citometar sastoji se od tri međusobno povezana sustava: protočni, optički te elektronski sustav. Protočni sustav sve stanice iz stanične suspenzije odvodi kroz uske kapilare do snopa laserskog svjetla. Osim stanične suspenzije, u ovom se dijelu nalaze i pokretačka tekućina te zračni potisak. Optički sustav sadrži laser s lećama, filtrima i osjetnicima. Laserskim svjetlom stanice se obasjaju te dolazi do raspršivanja svjetlosti. Stupanj raspršene svjetlosti određene valne duljine ukazuje na fizičke osobine stanica. Veličinu opisuje svjetlost koja bude raspršena pod malim kutom od 1,5 do 10°, FSC (eng. *forwardscatter*). Zrnatost opisuje ona svjetlost raspršena pod pravim kutom SSC (eng. *side scatter*). Elektronski sustav sve svjetlosne signale skuplja te ih prevodi u digitalne signale, oni se potom prenose kao elektronski zapis u elektroničko računalo i kao takvi se analiziraju (29). Za određivanje razine oksidativnog stresa (proizvodnje vodikovog peroksida i peroksinitrita) korišten je diklorofluorescein diacetat (DCF-DA, *Biomol, ThG*, Njemačka). DCF-DA bio je pripremljen kao otopina završne koncentracije 10 µM. 10 µL otopine dodano je 1×10^6 stanica izoliranih iz krvi i mezenteričnih limfnih čvorova, te su uzorci nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi resuspendirani u 450 µl PBS-a (engl. *phosphate buffer saline*, PBS). Potom su uzorci očitani na protočnom citometru te je nakon očitavanja svakom uzorku dodano 50 µL 200 nM forbol 12-miristat 13-acetat (PMA, *Calbiochem, Darmstadt*, Njemačka) za stimulaciju produkcije ROS- a, te su uzorci nakon 30 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi bili ponovno očitani. Za analizu uzoraka i pohranu podataka korišten je protočni citometar *FACS Canto II* (BD *Bioscience*; 488 laser za ekscitaciju te 530/30 BP filter za analizu) i *Diva 6* program. Završne analize učinjene su pomoću besplatnog programa za analizu FSC (eng. *flowing software*) datoteka.



Slika 8. Supernatant prikupljenih i pročišćenih PBMC-eva (Izvor: original autorice rada)

4.4. Statistička analiza

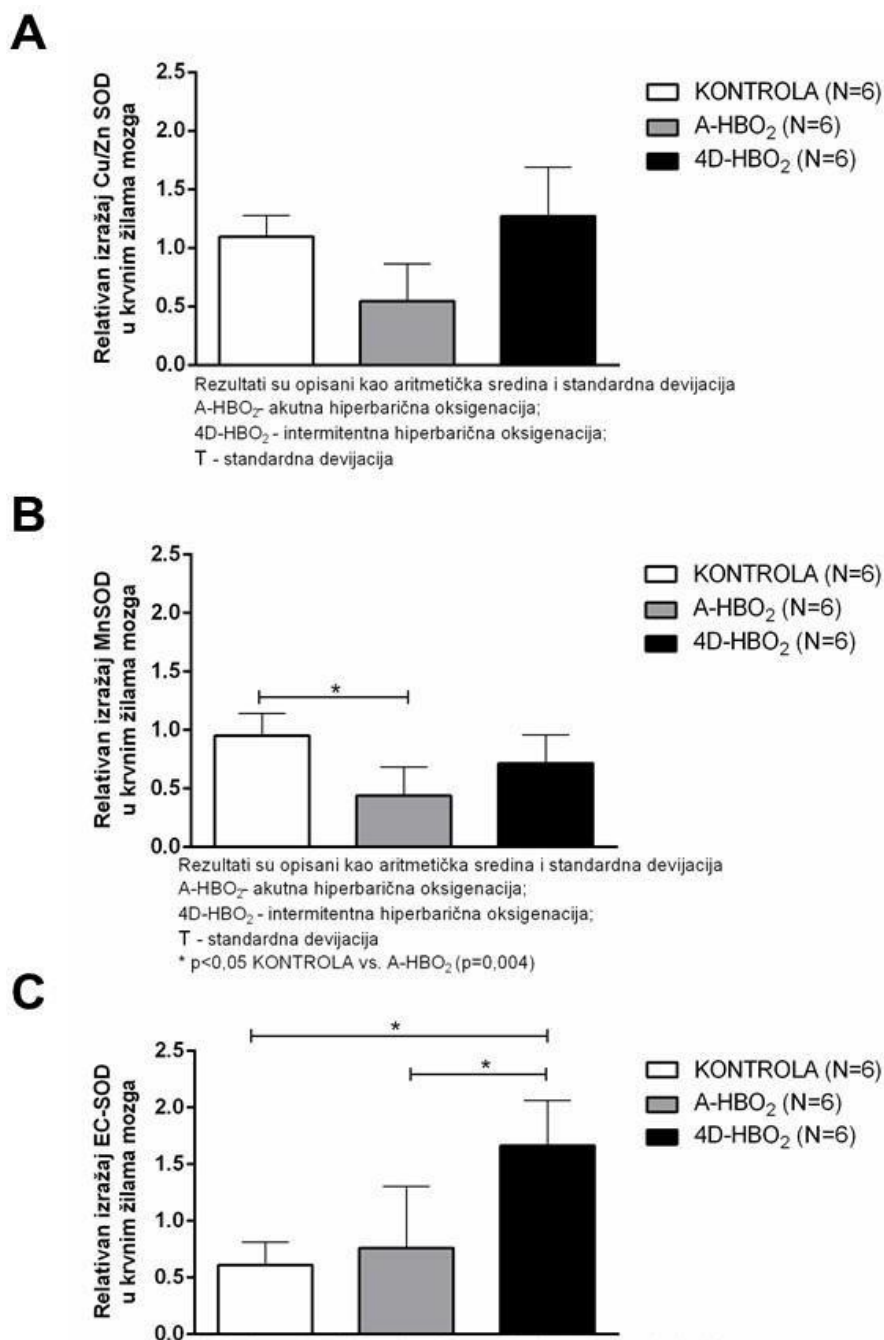
Svi rezultati prikazani su kao aritmetička sredina i standardne devijacije. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je *Kolmogorov-Smirnovljev* testom. Razlike su testirane jednosmjernom analizom varijanci za nezavisne uzorke *One-Way ANOVA* ili, u slučaju neravnomjerne distribucije dobivenih podataka, *Kruskal-Wallis* testom te *post hoc Tukey* testom. U slučaju usporedbe rezultata između 2 tretmana, koristili smo parni T-test ili *Wilcoxonov* test, ovisno o raspodijeli podatka. Za statističku analizu upotrijebili smo *Sigma Plotv. 12* (*Systat Software, Inc, Chicago, SAD*). Statistička je značajnost određena na $p < 0,05$.

5. REZULTATI

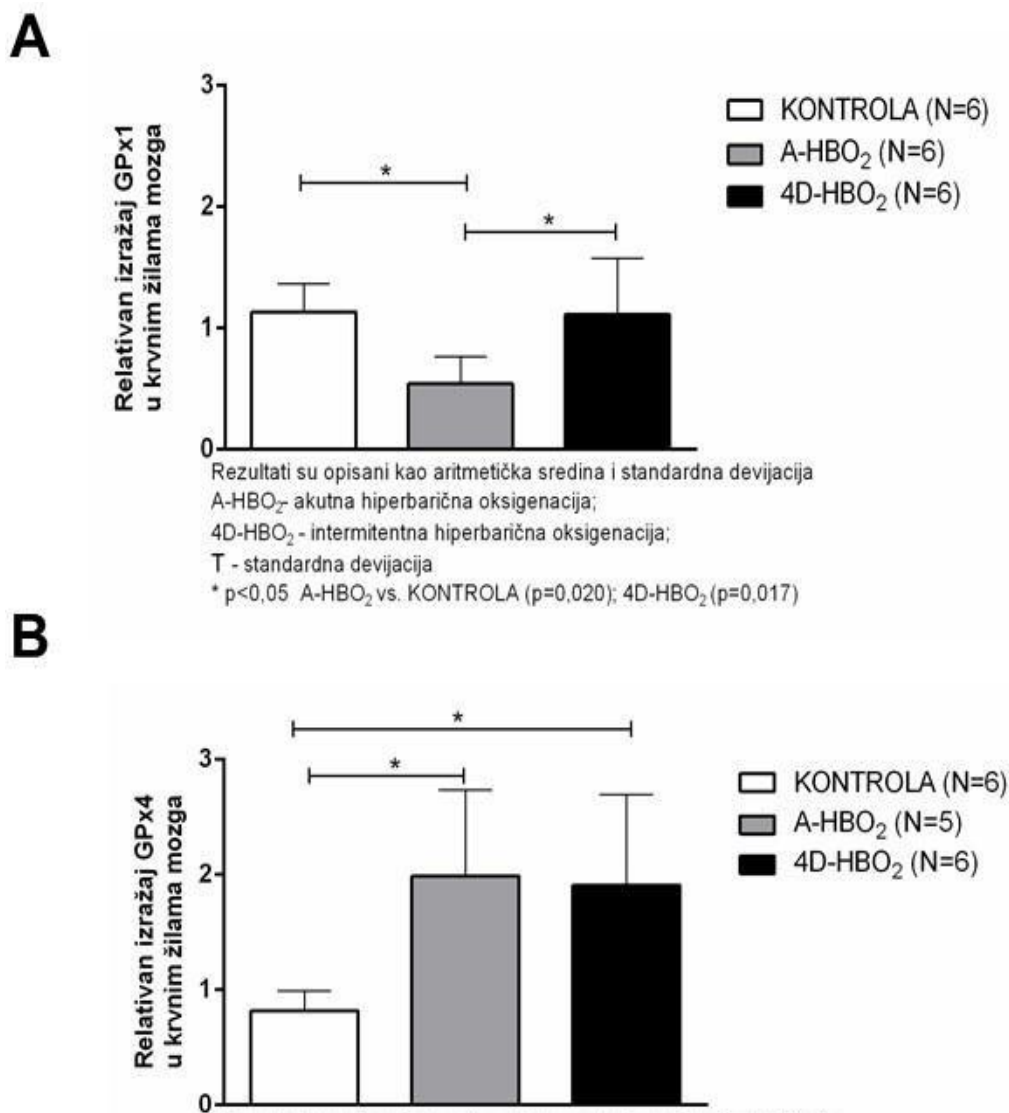
5.1. Relativan izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga štakora

U ovom istraživanju izolirana je ukupna mRNA (engl. *messenger RNA*) iz uzoraka krvnih žila mozga štakora koji su bili podvrgnuti akutnoj (A-HBO₂) ili intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (4D-HBO₂) i kontrolnih životinja, te je pomoću specifičnih PCR reakcija u stvarnom vremenu utvrđena ekspresija gena za antioksidativne enzime: izoforme superoksid dismutaze (*SOD*; *Cu/Zn SOD*, *MnSOD* i *EC-SOD*), izoforme glutation peroksidaze (*GPx*; *GPx1* i *GPx4*) i *CAT*.

Usporedbom rezultata između ispitivanih skupina nismo utvrdili statistički značajnu razliku za izražaj *Cu/Zn SOD* (Slika 9A; $p < 0,05$; jednosmjerna analiza varijanci i *Tukey post hoc* test). Genski izražaj *MnSOD* izoforme bio je značajno povećan u kontrolnoj skupini životinja u odnosu na A-HBO₂ tretiranu skupinu (Slika 9B; $p = 0,004$; jednosmjerna analiza varijanci i *Tukey post hoc* test). U slučaju *EC-SOD* izoforme, njezin izražaj u krvnim žilama mozga bio je značajno povećan u skupini 4D-HBO₂ u odnosu na kontrolnu skupinu životinja (Slika 9C; $p < 0,001$; jednosmjerna analiza varijanci i *Tukey post hoc* test) i A-HBO₂ skupinu (Slika 9C; $p = 0,003$; jednosmjerna analiza varijanci i *Tukey post hoc* test).



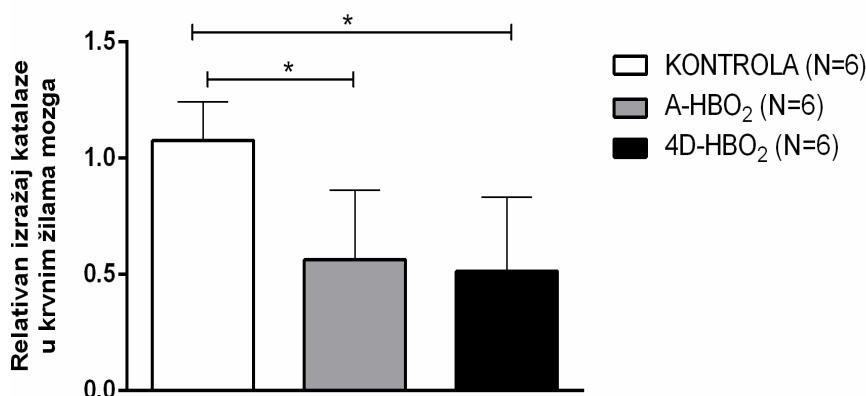
Sika 9. Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na relativan izražaj gena za izoforme superoksid dismutaze *Cu/Zn SOD* (A), *MnSOD* (B) i *EC-SOD* (C) u krvnim žilama mozga štakora. Rezultati su opisani kao aritmetičke sredine i standardne devijacije. **Legenda:** A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija; 4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija; KONTROLA – životinje koje nisu izlagane hiperbaričnoj oksigenaciji; T – standardna devijacija; * $p < 0,05$.



Slika 10. Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na relativan izražaj gena za izoforme glutacion peroksidaze *GPx1* (A) i *GPx4* (B) u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora. Rezultati su opisani kao aritmetičke sredine i standardne devijacije. **Legenda:** A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija; 4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija; KONTROLA – životinje koje nisu izlagane hiperbaričnoj oksigenaciji; T – standardna devijacija; * $p < 0,05$.

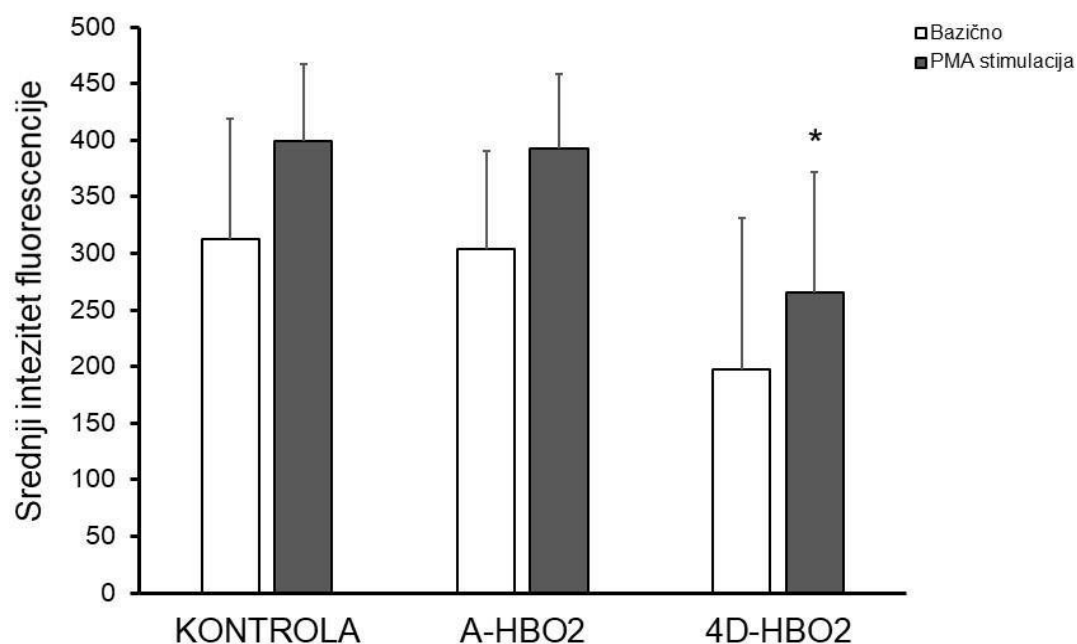
Izražaj *GPx1* značajno je bio smanjen u A-HBO₂ skupini u odnosu na kontrolnu skupinu (Slika 10A; $p = 0,020$; jednosmjerna analiza varijanci i *Tukey post hoc* test) i 4D- HBO₂ skupinu (Slika 10A; $p = 0,017$; jednosmjerna analiza varijanci i *Tukey post hoc* test). Slično tome, izražaj *GPx4* bio je značajno smanjen u kontrolnoj skupini životinja u odnosu na A-HBO₂ (Slika 10B; $p = 0,001$; jednosmjerna analiza varijanci i *Tukey post hoc*

test) i 4D-HBO₂ skupinu (Slika 10B; $p = 0,001$; jednosmjerna analiza varijanci i *Tukey post hoc test*).



Slika 11. Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na relativan izražaj gena za katalazu u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora. Rezultati su opisani kao aritmetičke sredine i standardne devijacije. **Legenda:** A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija; 4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija; KONTROLA – životinje koje nisu izlagane hiperbaričnoj oksigenaciji; T – standardna devijacija; * $p < 0,05$. Razina mRNA u krvnim žilama mozga Sprague-Dawley štakora bila je značajno snižena u obje skupine životinja koje su bile izložene hiperbaričnoj oksigenaciji u usporedbi s kontrolnim životinjama (KONTROLA vs A-HBO₂ $p = 0,010$ i KONTROLA vs 4D-HBO₂ $p = 0,008$; jednosmjerna analiza varijanci i *Tukey post hoc test*).

Bazična razina oksidativnog stresa, odnosno produkcije vodikovog peroksida i peroksinitrita, u mononuklearnim stanicama periferne krvi nije se mijenjala nakon akutne hiperbarične oksigenacije, dok nakon intermitentnog izlaganja zamjećujemo pad razine oksidativnog stresa. Međutim, razlike nisu bile statistički značajne (Slika 12, $p = 0,305$, jednosmjerna analiza varijanci). Slične razlike zamijetili smo i nakon stimulacije stanica s PMA (Slika 12, $p = 0,082$, jednosmjerna analiza varijanci). Stimulacija s PMA značajno je povećala proizvodnju vodikovog peroksida i peroksinitrita samo kod životinja koje su bile izložene intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (Slika 12, $p = 0,082$, *Studentov t test*).



Slika 12. Utjecaj akutne i intermitentne hiperbarične oksigenacije na razinu oksidativnog stresa u perifernim mononuklearnim stanicama Sprague-Dawley štakora. Rezultati su opisani kao aritmetičke sredine i standardne devijacije. **Legenda:** A-HBO₂ – akutna hiperbarična oksigenacija; 4D-HBO₂ – intermitentna hiperbarična oksigenacija; KONTROLA – životinje koje nisu izlagane hiperbaričnoj oksigenaciji; T – standardna devijacija; * $p < 0,05$.

6. RASPRAVA

Kisik je element neophodan za život svih organizama na Zemlji. Međutim, razna istraživanja dokazala su i njegovu visoku reaktivnost, pa samim time i potencijalnu toksičnost za organizam (1). Ukoliko njegova neumjerena reaktivnost i neuravnotežano stvaranje slobodnih radikala traje predugo, dolazi do oštećenja bioloških molekula. U tom slučaju sustav obrane tijela postaje neefikasan i normalne funkcije organizma se remete. S obzirom na to da kisik sudjeluje u mnogim važnim biokemijskim reakcijama, poput biosinteze ATP-a, aerobnoj glikolizi, β -oksidaciji masnih kiselina i oksidativnoj fosforilaciji, nije čudo kako njegovi slobodni radikali mogu oštetiti važne biološke molekule. Objavljeni znanstveni rezultati pokazuju razvoj brojnih bolesti uzrokovanih oksidativnim stresom, zbog poremećene hemodinamike, vaskularne funkcije, peroksidacije lipida, oksidacije proteina i slično (3). Slobodne kisikove vrste uglavnom nastaju u mitohondrijskom lancu za prijenos elektrona, gdje se 90 % kisika pretvara u vodu, dok se ostatak može pretvoriti u visoko reaktivne spojeve. Pokazalo se kako su zračenja i redukcija oksidativnih enzima najveći razlog pojačanog stvaranja i ROS-a i RNS-a (7,8).

Međutim, u malim koncentracijama, ROS i RNS imaju važnu ulogu kao medijatori upale i kao signalne molekule, te korisno sudjeluju u obrani organizma. Poznato je kako prilikom bilo kakve vrste ozljede tkiva dolazi do upale. Ključnu ulogu u upali imaju mononuklearne stanice imunološkog sustava, neutrofili i fagociti, koji infiltriraju upaljeno tkivo, tijekom čega stimulirani neutrofili otpuštaju velike količine ROS-a (13). Osim toga, u slučaju ozljede tkiva aktivira se NADPH-oksigenaza, za čije je djelovanje potreban kisik. Ovaj će enzim u leukocitima proizvesti veliku količinu oksidansa koji preveniraju infekciju oštećenog tkiva. Ako je stanica izložena visokim razinama ROS-a ili RNS-a, aktivira se upalni odgovor karakteriziran povećanim razinama TNF α i interleukini IL-6, IL-8, povećanim izražajem adhezijskih molekula i promotora oksidativnog stresa (26). Svaka stanica može biti meta ROS-a, no proučavanjem odabrane literature može se zaključiti kako stanice održavaju homeostazu unatoč proizvodnji slobodnih kisikovih vrsta, ne samo katabolizirajući ROS, nego i popravljajući oksidativnu ozljedu poticanjem staničnih zaštitnih i antioksidativnih mehanizama (30).

Dakle, kao odgovor na oksidativni stres, generiraju se tvari koje nazivamo antioksidansima. Mogu nastati *in situ* (endogeno) ili se unose u organizam (egzogeno).

Tvari su koje inhibiraju ili istjeruju stvaranje ROS-a i RNS-a donirajući ili prihvaćajući elektrone u bilo kojem trenutku. U tijelu se neprekidno obnavljaju, pa time održavaju spomenutu homeostazu između nastajanja i nestajanja kisikovih reaktivnih vrsta (16). Prema mehanizmu djelovanja, dijele se na enzimске i neenzimске antioksidanse te hvatače radikala. S obzirom na različite afinitete, najbrojnija su skupina hvatači radikala. Nazivaju se još i preventivni antioksidansi, te se unose egzogeno u organizam. Oni nemaju enzimsko djelovanje pa ih svrstavamo u neenzimске antioksidanse (vitamini, karotenoidi, flavonoidi, koenzim Q10 i sl.). S druge strane, enzimski antioksidansi kataliziraju slobodne radikale pa ih na taj način izravno neutraliziraju.

Posljednjih nekoliko godina uvelike je porastao interes u istraživanju utjecaja oksidativnog stresa u različitim patološkim stanjima. Trenutno je najveća pozornost usmjerena na proučavanje mijenjanja metabolizma ROS-a i sprječavanja njihova nastanka terapijom hiperbarične oksigenacije. Temelj ove terapije je udisanje 100 %-tnog kisika pri tlaku od 100 kPa, pa se time kisik 20 puta više otopi u krvi nego li njegovim udisanjem pri atmosferskom tlaku. Pokazalo se kako ovakva krv donosi više kisika povrijeđenim tkivima i velikom brzinom se ispravlja lokalna ili opća hipoksija. Kada se tlak udahnutog kisika poveća za 100 kPa, u 100 mL krvi se dopremi oko 2,4 mL kisika. Na taj način fizikalno otopljeni kisik zaobilazi eritrocitnu membranu i brže difundira u tkivo. Pri tome, kisik otopljen u plazmi dopire i do najudaljenijih stanica, za razliku od eritrocita kao glavnih nositelja kisika pri normalnom disanju (2, 22). Izravan porast razine otopljenog kisika s porastom korištenog tlaka kisika kod HBO dolazi do jasnog porasta parcijalnih tlakova plinova i do smanjenja volumena plinom ispunjenih prostora, prema *Boyleovom* zakonu (2). Porast pO_2 u tkivima izmjeren je u različitim eksperimentima. Primjerice, *van Hulst* i sur. utvrdili su linearan porast pO_2 u mozgu svinje (31). *Kessler* i sur. prikazali su porast transkutanog pO_2 izmjerenog oko kroničnih dijabetičnih ulkusa stopala u ljudi (32). Vršne razine pO_2 u ranama i trajanje njegova povišenja mijenjaju se tijekom HBO tretmana, kao što su pokazali *Rollins* i sur. kvantificirajući rane u štakora. Ustanovili su kako je vršna razina pO_2 tijekom izlaganja i jedan sat nakon izlaganja značajno manja petnaesti dan HBO tretmana u odnosu na peti dan tretmana.

Daljnji učinci hiperbarične oksigenacije očituju se na molekularnoj razini signalnih putova kroz pozitivnu ili negativnu regulaciju brojnih ključnih molekularnih faktoraprizdravlju i bolesti. Asano i sur. pronašli su kako HBO potiče bazalnu proteinsku ekspresiju faktora rasta fibroblasta (eng. *fibroblast growth factor*, FGF) i faktora rasta

hepatocita (eng. *hepatocyte growth factor*, HGF) te poboljšava perfuziju i regeneraciju mišića ishemičnih stražnjih udova u miša. Osim pozitivne regulacije, HBO može uzrokovati i negativnu regulaciju citokina i regulirati upalu. HBO suprimira citokinsku proizvodnju koju proizvode upalni stimulansi. Utječe na ekspresiju endotelnih staničnih adhezijskih molekula (eng. *cell adhesion molecules* – CAMs) i oslobađanje TNF α i endotelina (35, 36). Sposobnost utjecaja na veći broj citokina i upalnih medijatora na animalnim modelima i ljudima povezana je s potencijalno korisnim učincima u patološkim stanjima kao što su kronične rane i ishemija.

Smatra se kako su mitohondrijski apoptotični signalni putovi potencijalno važne mete djelovanja HBOT. Snižavaju razine superoksida, vodikovog peroksida u mitohondrijima i otpuštanje citokroma C u citosol. Osim toga, nakon reperfuzije, u štakora koji su prekondicionirani s HBO, smanjena je i aktivacija kaspaze-3 i kaspaze-9 (37). Suprotno tomu, neke studije s hematopoetičnim stanicama pokazale su kako HBO može inducirati apoptozu. Na primjer, jednokratno izlaganje HBO uzrokovalo je apoptozu limfocita putem mitohondrijskog mehanizma, a autori su zaključili kako se izmjereno povećanje Bcl-2 (eng. *B-cell lymphoma 2*) ekspresije može tumačiti kao protektivna mjera stanice (38). Čini se kako su učinci HBO na apoptozu djelomično dvoznačni i ponekad različiti u različitim stanicama.

Intermitentna HBO može predstavljati signale koji se percipiraju kao neka vrsta pseudohipoksije. Gu. i suradnici istraživali su učinak prekondicioniranja HBO na molekularne mehanizme neuroprotekcije u modelu žarišne cerebralne ishemije štakora. Došli su do zaključka da je za toleranciju ishemije prekondicioniranjem s HBO odgovorna indukcija HIF-1 α (eng. *hypoxia-inducible factor-1 alpha*) i eritropoetina. Ovo saznanje je zanimljivo zato što ishemijski stimulans, slabiji od praga koji izaziva oštećenje, dovodi do ishemijske tolerancije (39).

Istraživanje Drenjančević i sur. (26) je pokazalo kako akutno izlaganje hiperbaričnom kisiku dovodi do značajnog povećanja markera oksidativnog stresa u serumu uz istovremeno smanjenje antioksidativnog kapaciteta u odnosu na kontrolnu skupinu. Ponavljano izlaganje hiperbaričnoj komori i vrijeme između dvije terapije, bilo je promatrano kao intermitentna pseudohipoksija. Ovo stanje potencijalno dovodi do aktivacije nekih drugih adaptacijskih mehanizama kao što su antioksidativni enzimi. Nekoliko sveprisutnih primarnih antioksidativnih enzima (SOD, katalaza, podskupine peroksidaze) kataliziraju kaskadu reakcija pretvorbe ROS-a u stabilnije spojeve (kisik i

voda). Također je zabilježeno sniženje dijastoličkog krvnog tlaka, pH, $p\text{CO}_2$ i povećanje $p\text{O}_2$ u krvi (38).

Druga istraživanja fokusirala su se na određivanje promjena u indikatorima lipidne peroksidacije te u razini aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i sl. Dobiveni rezultati upućuju na velike razlike u dobivenim rezultatima, moguće kao posljedica korištenja različitih protokola (40-42).

Poznato je kako oksidativni stres može izravno utjecati na vaskularnu reaktivnost, stoga se i u ovom radu obraća pozornost na učinke HBO na enzime koji sudjeluju u regulaciji oksidativnog stresa u krvnim žilama i time posredno na potencijalne učinke HBO na vaskularnu reaktivnost. Rezultati našeg istraživanja su pokazali da akutno izlaganje životinja HBO_2 dovodi do značajnog smanjenja izražaja *MnSOD*, *GPx1*, *GPx* i *CAT*, što navodi na zaključak da oni nemaju bitnu ulogu u regulaciji povećanog oksidativnog stresa kako tijekom akutne, tako i tijekom intermitentne hiperbarične oksigenacije. Nasuprot tome, u našem istraživanju smo pokazali da izražaj *EC-SOD* te *GPx4* značajno raste tijekom akutnog izlaganja HBO te ono ostaje na istoj značajno višoj razini i nakon intermitentnog izlaganja tijekom 4 dana što sugerira njihovu važnu ulogu u regulaciji razine oksidativnog stresa i vaskularne reaktivnosti tijekom hiperbarične oksigenacije.

Zanimljiv je nalaz ove studije da akutno izlaganje HBO ne utječe na produkciju slobodnih radikala u perifernim mononuklearnim stanicama, međutim, intermitentno izlaganje je dovelo do pada razine oksidativnog stresa ispod bazičnih vrijednosti. Moguće objašnjenje zamijećenih promjena je HBO posredovana modulacija izražaja antioksidativnih enzima, kakvu smo dokazali u krvnim žilama.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata dobiveni su sljedeći zaključci:

- Akutno izlaganje životinja HBO_2 dovodi do značajnog smanjenja izražaja *MnSOD*, *GPx1* i *CAT*, dok intermitentno izlaganje dovodi do normalizacije njihovog izražaja. U slučaju *EC-SOD* te *GPx4*, akutno izlaganje HBO_2 dovelo je do porasta njihovih izražaja te ono ostaje na istoj značajno višoj razini i nakon intermitentnog izlaganja tijekom 4 dana. U mononuklearnim stanicama periferne krvi bazična razina oksidativnog stresa, kao i ona nakon stimulacije stanica s PMA, nije se mijenjala nakon akutne hiperbarične oksigenacije, dok nakon intermitentnog izlaganja zamjećujemo pad razine oksidativnog stresa. Međutim razlike nisu bile statistički značajne.
- Rezultati našeg istraživanja sugeriraju da intermitentno izlaganje Sprague-Dawley štakora hiperbaričnom kisiku dovodi do promjene u izražaju oksidativnih enzima, što može rezultirati smanjenom razinom slobodnih radikala u mononuklearnim stanicama periferne krvi.

8. SAŽETAK

Učinak hiperbarične oksigenacije na razinu oksidativnog stresa u mononuklearnim stanicama periferne krvi i izražaj gena za antioksidativne enzime u krvnim žilama Sprague-Dawley štakora

CILJ ISTRAŽIVANJA: Cilj istraživanja bio je utvrditi razinu oksidativnog stresa u mononuklearnim stanicama periferne krvi zdravih muških Sprague-Dawley štakora izloženih akutnoj i intermitentnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (HBO_2) te izražaj antioksidativnih enzima u krvnim žilama mozga istih životinja.

NACRT STUDIJE: Eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama

ISPITANICI I METODE: Istraživanje je provedeno na zdravim Sprague-Dawley štakorima muškog spola u starosti od 9 do 11 tjedana. Životinje su bile podijeljene u 3 skupine ($n = 6-8$): (1) životinje podvrgnute akutnoj hiperbaričnoj oksigenaciji (A- HBO_2); (2) životinje podvrgnute intermitentnoj HBO_2 tijekom 4 uzastopna dana (4D- HBO_2) te (3) skupina zdravih štakora koji nisu bili izloženi HBO_2 . Izražaj gena za izoforme superoksid dismutaze (*SOD*), izoforme glutathion dismutaze (*GPx*) te katalazu (*CAT*) u izoliranim moždanim žilama, određen je pomoću PCR-a u stvarnom vremenu, a razina oksidativnog stresa u mononuklearnim stanicama iz periferne krvi procijenjena je bojanjem stanica diklorofluorescein diacetatom (DCF-DA) i analizom na protočnom citometru.

REZULTATI: Akutno izlaganje životinja HBO_2 dovodi do značajnog smanjenja izražaja *MnSOD*, *GPx1*, *GPx* i katalaze, dok intermitentno izlaganje dovodi do normalizacije njihovog izražaja. U slučaju *EC-SOD* te *GPx4*, akutno izlaganje HBO_2 dovelo je do porasta njihovih izražaja te ono ostaje na istoj značajno višoj razini i nakon intermitentnog izlaganja tijekom 4 dana. U mononuklearnim stanicama periferne krvi bazična razina oksidativnog stresa, kao i ona nakon stimulacije stanica s PMA, nije se mijenjala nakon akutne hiperbarične oksigenacije, dok nakon intermitentnog izlaganja zamjećujemo pad razine oksidativnog stresa. Međutim, razlike nisu bile statistički značajne.

ZAKLJUČAK: Rezultati našeg istraživanja sugeriraju da intermitentno izlaganje Sprague-Dawley štakora hiperbaričnom kisiku dovodi do promjene u izražaju oksidativnih enzima, što može rezultirati smanjenom razinom slobodnih radikala u mononuklearnim stanicama periferne krvi.

KLJUČNE RIJEČI: hiperbarična oksigenacija, oksidativni stres, antioksidativni enzimi

9. SUMMARY

The effect of hyperbaric oxygenation (HBO₂) on the levels of oxydative stress and antioxydative enzyme expression in mononuclear cells from peripheral blood and secondary lymphoid organs of Sprague-Dawley rats

RESEARCH OBJECTIVE: The aim of the study was to determine the level of oxidative stress in the peripheral mononuclear blood cells of healthy male Sprague-Dawley rats exposed to acute and intermittent hyperbaric oxygenation, (HBO₂) and expression of antioxidant enzymes in the blood vessels of the same animals.

STUDY DESIGN: Experimental study on laboratory animals

MATERIALS AND METHODS: The study was conducted on healthy Sprague-Dawley male rats at 9 to 11 weeks of age. Animals were divided into 3 groups (n = 6-8): (1) animals undergoing acute hyperbaric oxygenation (A-HBO₂); (2) animals subjected to intermittent HBO₂ for 4 consecutive days (4D-HBO₂) and (3) a group of healthy rats that were not exposed to HBO₂. Gene expression for superoxide dismutase (*SOD*) isoforms, glutathione dismutase isoforms (*GPx*) and catalase (*CAT*) in isolated cerebellum was determined by real-time PCR, and the level of oxidative stress in peripheral mononuclear blood cells was estimated by cell staining dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) and flow cytometer analysis.

RESULTS: Acute exposure of HBO₂ animals leads to a significant decrease in the expression of *MnSOD*, *GPx1*, *GPx* and *CAT*, while intermittent exposure leads to a normalization of their expression. In the case of *EC-SOD* and *GPx4*, acute exposure to HBO₂ led to an increase in their expression and remained at the same significantly higher level after intermittent exposure for 4 days. In peripheral mononuclear blood cells, the baseline level of oxidative stress, as well as that after stimulation of cells with PMA, did not change after acute hyperbaric oxygenation, whereas after intermittent exposure, a decrease in the level of oxidative stress was observed. However, the differences were not statistically significant.

CONCLUSION: The results of our study suggest that intermittent exposure of Sprague-Dawley rats to hyperbaric oxygen leads to a change in the expression of oxidative enzymes, which can result in reduced levels of free radicals in peripheral mononuclear blood cells.

KEY WORDS: Hyperbaric oxygenation, oxidative stress, antioxidant enzymes

10. LITERATURA

1. Mohammed AA, Ibrahim AA. Pathological roles of reactive oxygen species and their defence mechanism. *Saudi Pharm J*.2004;12:1–18.
2. Thom SR. Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *Journal of applied physiology*.2009;106(3):988-95.
3. Štefan L, Tepšić T, Zavidic T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina*2007;43:84-93.
4. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*. 2000;49:3-8.
5. Ćosić A, Novak S, Jukić I, Stupin A, Mihaljević Z, Rašić L, i sur. Primjena laboratorijskih metoda u dijagnosticiranju oksidativnog stresa na primjeru animalnog modela prekomjernog unosa soli. *Cardiol Croat*.2017;12:78.
6. Frijhoff J, Winyard GP, Zarkovic N, Davies SS, Roland Stocker R, Cheng D, i sur. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2015;23:1144–1170.
7. Dumollard R, Carroll J, Duchen K, Campbell K, Swann K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Cell Dev Biol*.2009;20:346-353.
8. Đorđević VB, Pavlović DD, Kocić GM. Biohemija slobodnih radikala. Medicinski fakultet Niš;2000.
9. Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol*. 2003;552, 335–344.
10. Butterfield, D.A. et al. Elevated levels of 3-nitrotyrosine in brain from subjects with amnesic mild cognitive impairment: implications for the role of nitration in the progression of Alzheimer's disease. *Brain Res*.2007;1148,243–248.
11. Faraci, F.M. Oxidative stress: the curse that underlies cerebral vascular dysfunction? 2005. *Stroke* 36,186–188.
12. Hamel, E. Et al. (2008) Oxidative stress and cerebrovascular dysfunction in mouse models of Alzheimer's disease. *Exp. Physiol*. 93,116–120.
13. Dragun J. Učinkovitost galne kiseline na angiogenezu, oksidativni stres i rast tumora. Diplomski rad. 2016. Zagreb: Prirodoslovno- matematički fakultet (Biološkiodjek).
14. Takahashi M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev*2012;58:1-9.
15. Dröge W. (2002) Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. *ExperGeront*,37:1333–45.

16. Harper: Slobodni radikali i antioksidacijske hranjive tvari, in: Harperova ilustrirana biokemija, urednice: Jasna Lovrić, Jadranka Sertić, 2011., Medicinska naklada, Zagreb, 482-486.
17. V. K. Gopalakrishnan, T. Starlin: Enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of *Tylophora pauciflora* Wight and Arn.–an in vitro study, 2013., Asian Journal Of Pharmaceutical and Clinical Research, 4,68-71.
18. H. Sies: Strategies of antioxidant defense, 1993., European journal of biochemistry, 215,213-219.
19. Gill AL, Bell CN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. QJM. 2004; 97:385-95.
20. Tandara AA, Mustoe TA. Oxygen in wound healing--more than a nutrient. World J Surg. 2004;28:294-300.
21. Jacoby I. Emergency medicine: indications for hyperbaric oxygen therapy. West J Med. 1987;146:608.
22. Bilić I, Petri NM. Hiperbarična oksigenacija u liječenju infekcija središnjeg živčanog sustava. Infektološki glasnik.2013;33:4,177–181.
23. Anderson D, Nagasawa G, Norfleet W, Olszowka A, Lundgren C. O₂ pressures between 0.12 and 2.5 atm abs, circulatory function, and N₂ elimination. Undersea Biomed Res 1991; 18(4):279–92.
24. Demchenko IT, Luchakov YI, Moskvina AN, Gutsaeva DR, Allen BW, Thalmann ED, et al. Cerebral blood flow and brain oxygenation in rats breathing oxygen under pressure. J Cereb Blood Flow Metab. 2005;25:1288-300.
25. Nagatomo F, Fujino H, Takeda I, Ishihara A. Effects of hyperbaric oxygenation on blood pressure levels of spontaneously hypertensive rats. Clin Exp Hypertens. 2010; 32:193-7.
26. Drenjancevic I, Kibel A, Kibel D, Seric V, Cosic A. Blood pressure, acid-base and blood gas status and indicators of oxidative stress in healthy male rats exposed to acute hyperbaric oxygenation. Undersea Hyperb Med.2013;40:319-28.
27. Zhai WW, Sun L, Yu ZQ, Chen G. Hyperbaric oxygen therapy in experimental and clinical stroke. Med Gas Res. 2016;6:111-118.
28. Chomczynski P, Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction,Anal Biochem. 1987Apr;162(1):156-9.
29. Deliće H. Izražaj biljega CD15s na leukocitima štakora i biljega CD77 na štakorskom bubregu pod hiperbaričnim uvjetima. Diplomski rad. Medicinski fakultet Split.2015.

30. Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard S, Stehlik C, Wang L, Rojanasakul Y. Mitochondrial Superoxide Mediates Doxorubicin-Induced Keratinocyte Apoptosis through Oxidative Modification of ERK and Bcl-2 Ubiquitination. *Biochem Pharmacol.* 2012;15; 83(12):1643–1654.
31. Van Hulst RA, Haitisma JJ, Klein J, Lachmann B. Oxygen tension under hyperbaric conditions in healthy pig brain. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2003;23:143-8.
32. Kessler L, Bilbault P, Ortega F, Grasso C, Passemard R, Stephan D, et al. Hyperbaric oxygenation accelerates the healing rate of nonischemic chronic diabetic foot ulcers: a prospective randomized study. *Diabetes Care.* 2003;26:2378-82.
33. Rollins MD, Gibson JJ, Hunt TK, Hopf HW. Wound oxygen levels during hyperbaric oxygen treatment in healing wounds. *Undersea Hyperb Med.* 2006;33:17-25.
34. Asano T, Kaneko E, Shinozaki S, Imai Y, Shibayama M, Chiba T, et al. Hyperbaric oxygen induces basic fibroblast growth factor and hepatocyte growth factor expression, and 90 enhances blood perfusion and muscle regeneration in mouse ischemic hind limbs. *Circ J.* 2007;71:405-11.
35. Al-Waili NS, Butler GJ. Effects of hyperbaric oxygen on inflammatory response to wound and trauma: possible mechanism of action. *ScientificWorldJournal.* 2006; 6:425-41.
36. Buras J. Basic mechanisms of hyperbaric oxygen in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Int Anesthesiol Clin.* 2000;38:91-109.
37. Wang L, Li W, Kang Z, Liu Y, Deng X, Tao H, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats. *J Neurotrauma.* 2009;26:55-66.
38. Weber SU, Koch A, Kankeleit J, Schewe JC, Siekmann U, Stuber F, et al. Hyperbaric oxygen induces apoptosis via a mitochondrial mechanism. *Apoptosis.* 2009;14:97-107.
39. Dennog C, Radermacher P, Barnett YA, Speit G. Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen. *Mutat Res.* 1999;428:83-9.
40. Ay H, Topal T, Uysal B, Ozler M, Oter S, Korkmaz A, et al. Time-dependent course of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects in rat lung and erythrocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2007;34:787-91.

41. Simsek K, Ay H, Topal T, Ozler M, Uysal B, Ucar E, et al. Long-term exposure to repetitive hyperbaric oxygen results in cumulative oxidative stress in rat lung tissue. *Inhal Toxicol.* 2011;23:166-72.
42. Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, Leonard S, Stehlik C, Wang L, Rojanasakul Y. Mitochondrial Superoxide Mediates Doxorubicin-Induced Keratinocyte Apoptosis through Oxidative Modification of ERK and Bcl-2 Ubiquitination. *Biochem Pharmacol.* 2012;15; 83(12): 1643–1654.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Ivona Spudić

Datum rođenja: 15. svibnja 1995.

Adresa: Ivana Mažuranića 24, Vinkovci

e-pošta: ivonaspudic155@gmail.com

Obrazovanje:

2010. – 2014. Gimnazija Matije Antuna Reljkovića, Vinkovci (opći smjer)

2014. – 2017. Sveučilišni preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

2017. – 2019. Sveučilišni diplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Dodatna usavršavanja:

2001. – 2011. „Linguapax“, škola stranih jezika (položen FCE ispit)